

明細書

B L アンジオスタチンを含む制がん剤

技術分野

5 本発明は B L アンジオスタチンを含む制がん剤及びその製造方法に関する。

背景技術

10 血管の新生を阻害する物質は、癌の増殖、浸潤、転移を抑制することから、抗腫瘍剤としての用途が期待されており、このような物質の一つとしてアンジオスタチンが知られている。アンジオスタチンは、血液中に存在する、線溶因子であるプラスミノーゲンを分解することにより得られる分子量約 40,000 のタンパク質であり、動物実験では、癌に対して劇的な効果を示すことが報告されている (M. S. O'Reilly et al., Cell, 79, 315-328 (1994))。

15 アンジオスタチンには、(1) プラスミノーゲンをエラスターーゼで加水分解したもの (M. S. O'Reilly et al., Nature Medicine, 2, 689-692 (1996)) 及び (2) 遺伝子組換え技術を用いて酵母に直接生産させたもの (B. K. Sim et al., Cancer Research 57, 1329-1334 (1997)) の 2 種類が知られていた。

20 しかし、(1) では、エラスターーゼの基質特異性の低さのため、副生成物が多く生じ、プラスミノーゲンからアンジオスタチンを選択的に生成させることが困難であることから、アンジオスタチンの活性が低いという欠点があった。また、(2) では、アンジオスタチンの精製が困難であり、高コストであり、また、水に対する溶解性が低いという問題があった。

25 最近、*Bacillus megaterium* A9542 株が産生するプロテアーゼであるバシロライシン MA を用いて、ヒトプラスミノーゲンを特異的に切断したアンジオスタチン様断片 (主に G¹ u¹-S e r⁴⁴¹、以降、「B L アンジオスタチン」と記載する。) が開発された。(特開 2002-272453 号公報)。ヒトプラスミノーゲンのアミノ酸配列は公知であり、SWISSPROT に受入番号 P 00747 として登録されている。なお、ヒトプラスミノーゲンのアミノ酸配列は、シグナルペプチド (M e t¹-G l y¹⁹) を含むものであるため、本出願で

は、シグナルペプチドを除外した成熟ポリペプチド、すなわち、Glu¹-Asn⁷⁹¹のアミノ酸配列に基づくアミノ酸番号でアミノ酸位置を示した。

また、組換えアンジオスタチンは、天然型に比べて物理的性質と活性にばらつきがあり、これは異種生物での発現の過程でのタンパク質フォールディングの差に基づく立体構造の変化、糖鎖修飾の差などが原因と考えられる (Cao, Y., Int J Biochem Cell Biol 33, 357-69 (2001)、Dell'Eva, R., et al., Endothelium 9, 3-10 (2002))。また、同様の原因により、組換えタンパク質の溶解性が低いことも指摘されている。これらの点で、組換え体と比較して、酵素法により生産される天然型が有利である。

しかし、タンパク質解酵素の基質認識が特異性であることから、プラスミノーゲンから選択的にアンジオスタチンを生成することは、極めて困難であり、多くの副産物を生成するという欠点があった。

また、すべての市販エラスターーゼ標品が活性のあるアンジオスタチンを生産することができるわけではなく、切断、その後の処理によってアンジオスタチンを変性させる可能性も示唆されている (O'Reilly et al., Nat Med 2, 689-92 (1996))。

バシロライシンMAは、プラスミノーゲンを極めて選択的に切断し、BLアンジオスタチン（主生成物としてGlu¹からSer⁴⁴¹のアミノ酸配列を有するフラグメント、微量生成物として、Phe⁷⁵からSer⁴⁴¹、Glu¹からVal⁴⁴⁹、およびPhe⁷⁵からVal⁴⁴⁹のアミノ酸からなるフラグメント）を生じせしめる（特開2002-272453号公報）。

更に発明者らは、バシロライシンMA固定化リアクター（アフィニティートラップリアクター）を開発し、ヒト血漿から1段階のステップでGlu¹からSer⁴⁴¹のアミノ酸配列を有するフラグメントを主成分とするプラスミノーゲンフラグメントの製造技術を開発し（PCT/JP03/00338）、製造時間の短縮とコスト削減を達成した。

組換えアンジオスタチンはLeu⁷⁴からLeu⁴⁵¹のアミノ酸からなるプラスミノーゲンの内部フラグメントである (Sim, B. K. et al. Cancer Res 57, 1329-34 (1997)) のに対し、BLアンジオスタチンは、上述のようにアンジオス

タチンとは異なる構造を有するが、アンジオスタチンと同様の抗血管内皮細胞作用をもつ。

特に、主生成物である $G1u^1$ から Ser^{441} のアミノ酸配列を有するフラグメント、更に $G1u^1$ から Val^{449} のアミノ酸配列を有するフラグメントは、
5 プラスミノーゲンの N 末端側を含むものである。

プラスミノーゲンの N 末端ペプチド ($G1u^1$ から $G1u^{83}$) は親水性アミノ酸に富み、N 末端ペプチドの有無の差は BL アンジオスタチンとアンジオスタチンとの間に、溶解性などの物理的特性だけではなく、生体内での活性、動態などにも差異をもたらすと考えられる。

10 しかし、BL アンジオスタチンが、実際に、インビボでの制がん効果を有するとの報告はまだなされておらず、安価で、水に対する溶解性が高く、かつ、優れた制がん性を有する制がん剤及びその製造方法の開発が待たれている。

本発明者は、上記の BL アンジオスタチンのがんに対する効果について鋭意研究を行なった結果、驚くべきことに、BL アンジオスタチンが極めて優れた制がん効果を有し、かつ、水に対する溶解性が高いことから、静脈内投与によっても格別の制がん効果を奏することを発見して、本発明を完成するに至った。
15

また、本発明者は、BL アンジオスタチンの製造の際に、バシロマイシン MA による自己消化の阻害剤であるイソプロピルアルコールを用いないでも、効率よく BL アンジオスタチンを得ることができることを発見して、本発明を完成する
20 に至った。

発明の開示

本発明は、BL アンジオスタチンを有効成分として含む制がん剤及びその製造方法に関する。

25

図面の簡単な説明

図 1 は、アフィニティートラップリアクターにより精製した BL アンジオスタチンを示す。レーン 1 は、得られた BL アンジオスタチンである。レーン 2 は、バシロライシン MA (5 nM)、プラスミノーゲン (3 μ M) を 100 mM NaCl、

0. 01% Tween 80、1 mM CaCl₂を含む50 mM トリス塩酸 (pH 7. 4) 10 μl 中で37°C、60分間インキュベートした後、10 μl のサンプル緩衝液 (4% SDS、10% 2-メルカプトエタノール、20% スクロース、0. 004% プロモフェノールブルーを含む125 mM トリス塩酸緩衝液、pH 6. 8) を加えレーン1と同様に分析した。

図2は、皮下移植ルイス肺がんの増殖に対するBLアンジオスタチンの効果 (腫瘍体積の推移) を表す。X軸はルイス肺がんを移植してからの日数 (日) であり、Y軸は腫瘍体積 (mm³) である。●は、対照群を、▲、■、×及び◆は、それぞれ、BLアンジオスタチン0. 3、1、3及び10 mg/kg/day 処理群を表し、それぞれの値は、各群8例の平均値土標準偏差を表す。Dunnettの多重比較検定で、対照群と比較して統計的に有意な差は*印を付してある。* (p < 0. 05)、** (p < 0. 01)

図3は、皮下移植ルイス肺がんの増殖に対するBLアンジオスタチンの効果 (腫瘍湿重量) を表す。X軸はBLアンジオスタチンの用量 (mg/kg/day) であり、Y軸は腫瘍湿重量 (mg) である。それぞれの値は、各群8例の平均値土標準誤差を表す。Dunnettの多重比較検定で、対照群と比較して統計的に有意な差は*印を付してある。* (p < 0. 05)、** (p < 0. 01)

図4は、ルイス肺がん皮下移植動物の体重に対するBLアンジオスタチンの影響を表す。X軸はルイス肺がんを移植してからの日数 (日) であり、Y軸は体重 (g) である。●は対照 (生理食塩水) 処理群であり、▲は、アンジオスタチン0. 3 mg/kg/day 処理群であり、■は、アンジオスタチン1 mg/kg/day 処理群であり、×は、アンジオスタチン3 mg/kg/day 処理群であり、◆は、アンジオスタチン10 mg/kg/day 処理群である。それぞれの値は、各群8例の平均値土標準誤差を表す。Dunnettの多重比較検定で、対照群と比較して統計的に有意な差は*印を付してある。* (p < 0. 05)、** (p < 0. 01)

図5は、腫瘍の病理組織像及びvon Willebrand因子免疫染色像を表す。対照群 (腫瘍長径8. 2 mm、短径7. 8 mm) (A、B、C、D)、3 mg/kg 投与群 (腫瘍長径7. 0 mm、短径5. 6 mm) (E、F、G、H) および10 mg/kg 投与群 (腫瘍長径4. 4 mm、短径2. 8 mm) (I、J、

K、L) の代表例を示す。D、HおよびLはvon Willebrand因子免疫染色、それ以外はヘマトキシリン・エオシン染色。倍率は、5倍 (A、E、I)、25倍 (B、F、J)、100倍 (C、G、K)、および50倍 (D、H、L)。

5

発明を実施するための最良の形態

本発明のBLアンジオスタチン

本発明のBLアンジオスタチンは、プロテアーゼ、特に、バチラス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) A9542が产生する酵素であるバシロライシンMA (BLMA) を用いてプラスミノーゲンを処理することによって得ることができる。バチラス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) A9542は、産業技術総合研究所生命工学研究所の特許生物寄託センターに平成13年3月21日に受託番号FERM P-18268として寄託されている。BLMAのアミノ酸配列は、特開2002-272453に開示されている。

BLMAは、ヒトプラスミノーゲンのSer⁴⁴¹-Val⁴⁴²、Leu⁷⁴-Phe⁷⁵及びVal⁴⁴⁹-Leu⁴⁵⁰の間を切断し、Glu¹-Ser⁴⁴¹、Glu¹-Val⁴⁴⁹、Phe⁷⁵-Ser⁴⁴¹、Phe⁷⁵-Val⁴⁴⁹の4種類のアンジオスタチン様活性を有する断片を生成することが知られている。

本発明の制がん剤としては、上記の4つのアンジオスタチン様断片の1種類以上を単独でか又は組み合わせて用いることができるが、特に、Glu¹-Ser⁴⁴¹が好ましく用いられる。

プラスミノーゲンは、哺乳動物、特にヒトやウシにおいて、そのアミノ酸配列が高度に保存されていることが知られている。したがって、本発明のBLアンジオスタチンの製造のための原料としてのプラスミノーゲンは、哺乳動物に由来するものであればあらゆるものを用いることができ、特に、ヒトやウシ由来のプラスミノーゲンが好ましい。

また、本発明のBLアンジオスタチンは、化学合成又は遺伝子組み換え技術によっても製造することができる。比較的容易な操作でかつ大量に製造できるという点では、遺伝子組み換え技術による製造が好ましい。本発明のBLアンジオス

タチンを製造するには、該タンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを作製し、これを好適な発現系に導入することにより目的タンパク質を製造することができる。

本発明のBLアンジオスタチンの塩基配列を有するDNAは、ヒト由来（例えば、HepG2細胞由来など）のcDNAライブラリーを、BLアンジオスタチンのアミノ酸配列をコードする塩基配列の情報に基づいて設計した好適なプライマー又はプローブを用いてスクリーニングすることにより入手できる。スクリーニングはブラークハイブリダイゼーション等で行うことができる。あるいは、ヒト由来（例えば、HepG2細胞由来など）のcDNAライブラリーを鋳型として使用し、上記塩基配列の情報に基づいて設計した好適なプライマーを用いてPCRを行うことにより、目的遺伝子を直接クローニングすることもできる。

組み換えタンパク質を発現させるための発現系（遺伝子を含む発現ベクターとその宿主）は当業者に公知である。DNAを宿主細胞中で発現させるためには、まず、該DNAを発現ベクター中のプロモーターの下流に挿入し、次いでこの組み換え発現ベクターを、当該発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

細菌用の発現ベクターとしては、pGEMEX-1 (Promega)、pQE-9 (QIAGEN)、pQE-30 (QIAGEN)、pRSET (Invitrogen)、pLEX (Invitrogen) などが挙げられ、動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNA I、pcDM8 (フナコシ)、pcDNA I / AmP (Invitrogen)、pREP4 (Invitrogen) や、組換えウイルス作成用発現ベクター、例えば、pMFG (Takara) が挙げられる。

細菌用の発現ベクターに用いることができるプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター等を挙げることができる。酵母用の発現ベクターに用いることができるプロモーターとしては、例えば、PHO5プロモーター、GAPプロモーターを挙げることができる。動物細胞用の発現ベクターに用いることができるプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、アデノウイルスのプロモーター、メ

タロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターを挙げることができる。

宿主細胞としては、目的タンパク質を発現できるものであれば特に制限されず、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。

組換えベクターの宿主への導入方法は、例えば、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リポフェクション法などが挙げられ、宿主細胞の種類に応じて適宜選択することができる。

形質転換体の培養物から、目的の組み換えタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いることができる。例えば、組み換えタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法を単独でか又は組み合わせて用い、精製することができる。

また、本発明は、下記工程：

アガロースゲル上にバシロライシンMA及びリシンを固定したアフィニティーラップリアクターを緩衝液で平衡化する工程、

20 クエン酸処理した血清を添加する工程、

塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄する工程、及び

6-アミノヘキサン酸で溶出する工程からなる、BLアンジオスタチンの製造方法であって、上記緩衝液が、イソプロピルアルコールを含まないことを特徴とする、製造方法にも関する。好ましくは、全ての操作を4°Cで行う。これによって、BLアンジオスタチンを高収率で得ることができる。

本発明の制がん剤は、一般的には、有効成分としてのBLアンジオスタチンと担体、賦形剤などの製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で提供される。

本発明の制がん剤は、ヒトを含む哺乳動物に医薬として投与することができる。

本発明の薬剤の投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与（例え

ば、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など) の何れでもよい。

BLアンジオスタチンは、先行技術のアンジオスタチンとは異なり、水に対する溶解度が高い (20 mg/ml 以上) ことから、本発明の制がん剤は、静脈内投与によって投与することができるという特徴を有する。

本発明の制がん剤の形態は特に限定されず、経口投与のための製剤としては例えば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、液剤、シロップ剤などが挙げられ、非経口投与のための製剤としては例えば、注射剤、点滴剤、座剤、吸入剤、経粘膜吸収剤、経皮吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。本発明の薬剤の形態、使用すべき製剤用添加物、製剤の製造方法などは、いずれも当業者が適宜選択することができる。

本発明の薬剤の投与量は、患者の性別、年齢または体重、症状の重症度、予防または治療といった投与目的、あるいは他の合併症状の有無などを総合的に考慮して適宜選択することができる。投与量は、一般的には、0. 1 mg/kg 体重/日～100 mg/kg 体重/日、好ましくは1 mg/kg 体重/日～10 mg/kg 体重/日である。

本発明の制がん剤は、乳がん、肺がん、咽頭がん、胃がん、膵がん、肝がん、結腸がん、子宮がん、卵巣がん、等の治療に用いることができる。

20 実施例

以下に、本発明について具体的に説明するが、本発明は実施例に記載されたものに限定されるものではない。

例 1. バシロライシンMAの生産及び精製

バシロライシンMAは、Bacillus megaterium A9542 株 (寄託番号 F E R M P-18268 で経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所特許生物寄託センターに寄託されている) から、以下の方法により分離精製した。

グルコース 1%、コーンスターク 3%、大豆ミール 1%、ペプトン 0. 5%、イースト抽出物 0. 5%、CaCO₃ 0. 2%、CB442 0. 01% の成分を含む液体培地 (pH 7. 0) 100 ml を含む 500 ml 容三角フラスコで、

Bacillus megaterium A9542 株を 28°C で 6 日間振とう培養後、培養液 3 リットルをセライトを用いてろ過し、そのろ液 1 リットルを H₂O で 5 リットルに希釈し、イソプロピルアルコールを最終濃度 5% (v/v) となるように添加した。その後、20 mM MES (2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸) -NaOH 緩衝液 (pH 6.5) / 5% イソプロピルアルコールで平衡化した 400 ml のカルボキシメチルセルロース(生化学工業株式会社)カラムに流速 1.5 ml/分で注入した。同じ緩衝液 600 ml で洗浄した後、20 mM MES / NaOH (pH 6.5) / 5% イソプロピルアルコール / 0.2 M NaCl で溶出した。その溶出画分を 60 ml ずつ分画し、活性の認められた画分を集めた。その純度を SDS-PAGE で確認し、精製物 90 mg を得た。

例 2. バシロライシン MA 及びリシンを固定した本発明のアフィニティートラップリアクターの作成 (リアクター 10 ml を作成)

臭化シアンであらかじめ活性化しておいたアガロースゲル (セファロース 4 B、ファルマシア社) 2.86 g を 1 mM HCl 溶液 100 ml に懸濁し、室温で 15 分間攪拌した。これをカラムに移し、吸引して HCl 溶液を除去し、1 mM HCl 溶液 100 ml で 3 回、次に 0.5 M NaCl、5% イソプロピルアルコールを含む緩衝液 A (0.1 M 炭酸水素ナトリウム、pH 8.3) 75 ml で 1 回ゲルを洗浄した。2.84 mg/ml のバシロライシン MA 溶液を同じ緩衝液 A で作成し、その 17.6 ml をカラムに添加し、室温で 2 時間攪拌することによって、固定化反応を行なった。反応終了後、吸引により溶液を除去し、0.2 M L-リシン塩酸塩を含む 5% イソプロピルアルコール水溶液 (pH 8.0) 20 ml を加えて、室温で 2 時間攪拌することによりリシンの固定化反応を行なった。反応終了後、溶液を吸引により除去し、5% イソプロピルアルコールを含む、緩衝液 B (20 mM MES (2-[モルホリノ]エタンスルホン酸) -NaOH) 500 ml でゲルを洗浄し、最後に 0.02% アジ化ナトリウムを含む、上記組成の緩衝液 B 中、4°C で保存した。

例 3. バシロライシン MA / リシンリアクターを用いた、ヒト血漿からの BL アンジオスタチンの一段階精製プロセス

クエン酸処理したヒト血漿 95 ml にイソプロピルアルコール 5 ml を氷上で添

5 加し、30分間放置した後、遠心分離（22,000×g、4℃、1時間）により上清を得、ろ過した。以降の操作はすべて4℃で行なった。例2で作成した本発明のバシロライシンMA／リシンリアクター10mlを、5%イソプロピルアルコールを含む緩衝液C（25mM リン酸ナトリウム、pH 7.4）で平衡化した。平衡化したリアクターに、上記の上清を流速1.5ml/分で添加した。その後、0.5M NaClを含む上記組成の緩衝液C 200mlでリアクターを洗浄した（3ml/分）。生成したBLアンジオスタチンの溶出は、200mMの6-アミノヘキサン酸を含む5%イソプロピルアルコール溶液50mlで行なった。その結果、ほとんどのBLアンジオスタチンは、10～30mlの溶出液で溶出された。BLアンジオスタチンの収量は、4.2mgであり、純度は95%であった。

10 なお、使用後のリアクターは、1MのNaClと200mMの6-アミノヘキサン酸を含む上記組成の緩衝液C 50mlを用いて4℃で洗浄した。その後、0.02%アジ化ナトリウムを含む緩衝液C中、4℃で保存した。この状態で洗15 浄、保存したリアクターは、2ヶ月以上繰り返して使用可能であった。

15 例4. バシロライシンMA／リシンリアクターを用いた、ヒト血漿からのBLアンジオスタチンの一液精製プロセス（イソプロピルアルコールを用いない方法）

20 クエン酸処理したヒト血漿を15,000 rpm、20分間遠心して、上清を得た。以下の操作は、すべて4℃で行った。例2で作製した本発明のバシロライシンMA／リシンリアクター0.5mlを、緩衝液Cで平衡化した。これに、上記の上清2.5mlを流速0.1ml/分で添加した。その後、15mlの0.5M 塩化ナトリウムを含む緩衝液Cで洗浄（0.15ml/分）後、2.5mlの200mM 6-アミノヘキサン酸で溶出した。大部分のBLアンジオスタチンは、0から1.5mlの溶出液で溶出された。BLアンジオスタチンの収量は63μg 25 で純度は94%であった（図1）。

なお、使用後のリアクターは、1MのNaClと200mMの6-アミノヘキサン酸を含む緩衝液C 2.5mlを用いて洗浄した。その後、0.02%アジ化ナトリウムを含む緩衝液C中、4℃で保存した。この状態で、保存したリアクターは

2ヶ月以上繰り返して使用可能であった。

得られたBLアンジオスタチンのうち4 μ gを精製水に溶解して10 μ lとし、これに10 μ lのサンプル緩衝液(4%SDS、10%2-メルカプトエタノール、20%スクロース、0.004%のプロモフェノールブルーを含む125mMトリス塩酸緩衝液、pH6.8)を加え、そのうち10 μ lを、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分画した後、クーマシーブリリアントブルーR250で染色した(図1)。

例5. BLアンジオスタチンのルイス肺がんに対する効果

・がん種及びがんの移植方法、試験動物

ルイス肺がん細胞をC57BL/6マウスに皮下移植して継代維持した。10-14日目の腫瘍を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水にがん細胞を懸濁した。5週齢で購入し、その後1週間SPF環境下で予備飼育したBDF₁マウスの腹側部皮下に、1匹当たり 1×10^5 個の細胞を含む0.05mlの細胞懸濁液を移植した。以後の実験もすべてSPF環境で行った。

・薬剤調製方法、投与方法、投与条件

例3の方法で調製したBLアンジオスタチンを凍結乾燥し、これを精製水に対して、2時間、3回透析した。得られた溶液を凍結乾燥して、20mg/mlとなるように生理食塩水に溶解した。この溶液を孔径0.22 μ mのフィルターを用いてろ過滅菌した。この溶液をさらに滅菌生理食塩水で希釈して、0.06mg/ml、0.2mg/ml、0.6mg/ml及び2mg/mlの溶液を作製した。ルイス肺がん細胞の移植の翌日から、上記のBLアンジオスタチン溶液を、5ml/kgの割合で毎日1回14日間静脈内投与した。これにより、それぞれの投与量は、0.3、1、3、および10mg/kgとなった。対照群には、生理食塩水を同容量静脈内投与した。各群の動物数は10匹とした。

・観察項目

投与期間中は、腫瘍の大きさ(短径及び長径から腫瘍体積を以下のように算出:短径の2乗×長径×0.52)及び体重を毎日測定した。投与終了翌日、エーテル麻酔下にマウスを致死させ、腫瘍を摘出してその湿重量を測定した。各群の最大及び最小値を除外して、計8匹の動物のデータを統計処理した。有意差

の検定にはD u n n e t t の多重比較検定を用い、危険率0.05%以下を有意差とした。更に、対照群、3 mg/kg 投与群および10 mg/kg 投与群の代表例各3個体から得られた腫瘍について、長径および短径の測定、細胞増殖、出血、壊死、分裂細胞の組織学的観察、および抗von Willebrand因子抗体を用いた血管内皮細胞の免疫染色を行った。

5 · 観察結果、考察

対照群と比較して、ルイス肺がん移植後10日目移行、3及び10 mg/kg BLアンジオスタチン投与群において、腫瘍体積が有意に低下した（図2）。10 mg/kg 投与群においてはすべての観察期間で、腫瘍体積は対照群の1/2以下であった。0.3及び1 mg/kg 投与群においても腫瘍成長の抑制が観察されたが統計的に有意な差となったのは、0.3 mg/kg 投与群で14及び15日目、1 mg/kg 投与群で14日目であった（図2）。また、移植後15日目に腫瘍を摘出して、その湿重量を測定したが、BLアンジオスタチン投与群では対照群と比較して、50-70%の値となった（図3）。0.3、3及び10 mg/kg 投与群における差は統計的に有意な差であった。一方、飼育期間を通して各群の体重に有意な差は見られなかった（図4）。また、動物の一般状態も、試験群間の差は見られなかった。

20 摘出した腫瘍の病理組織学的検査の結果を表1にまとめた。対照群では、細胞増殖が高度に（図5 A）、出血が軽度に（図5 B）、壊死が軽微に（図5 B）、分裂細胞が中等度に（図5 C）認められた。また、抗von Willebrand因子抗体による血管内皮細胞の免疫染色では、陽性細胞の割合が軽度から中等度に認められた（図5 D）。BLアンジオスタチン3 mg/kg 投与群では、細胞増殖が中等度に（図5 E）、出血が軽度に（図5 F）、壊死が軽度に（図5 F）、分裂細胞が中等度に（図5 G）、von Willebrand因子陽性細胞の割合が軽微から中等度に（図5 H）認められた。更に、BLアンジオスタチン25 10 mg/kg 投与群では、細胞増殖が軽微から中等度に（図5 I）、出血が軽微から中等度に（図5 J）、壊死が軽度から高度に（図5 J）、分裂細胞が軽微から軽度に（図5 K）、von Willebrand因子陽性細胞の割合が軽微から軽度に（図5 L）認められた。

表 1. 腫瘍の病理組織学的検査および von Willebrand 因子免疫染色検査の結果

用量 (mg/kg)	0			3			10		
腫瘍の病理組織学的所見 (ヘマトキシリン・エオシン染色)									
長径	10.6	7.6	8.2	7.4	7.0	7.1	5.5	6.7	4.4
短径	5.0	7.5	7.8	5.6	5.6	4.2	2.8	6.2	2.8
細胞増殖	+++	+++	+++	++	++	++	±	++	+
出血	+	+	+	+	+	+	++	±	+
壊死	±	-	±	+	+	+	+++	+	++
分裂細胞	++	++	++	++	++	++	±	+	±
腫瘍の von Willebrand 因子免疫染色所見 (陽性血管の割合)	+	++	++	+	++	±	±	+	±

以上のことから、1日当たり 0.3 mg/kg~1.0 mg/kg の B L アンジオスタチンの静脈内投与は、皮下移植ルイス肺がんの成長の抑制に有効であることが示された。また、腫瘍の病理組織学的検査の結果から、B L アンジオスタチンの投与により、腫瘍細胞の分裂増殖の低下、壊死の増加がおこることが示された。さらに、抗 von Willebrand 因子抗体による血管内皮細胞の免疫染色により、B L アンジオスタチンが、がんの新生血管を抑えていることが確認され、この血管新生阻害作用が、上述の腫瘍細胞の分裂増殖の低下、壊死の増加をもたらすものと考えられる。また、試験動物の体重や一般状態に影響しないことから、B L アンジオスタチンは重篤な副作用を持たないものと推測される。臨床予測性に優れたルイス肺がんの成長を抑制したことから、他の多くのがん（乳がん、肺がん、咽頭がん、膵がん、肝がん、結腸がん、子宮がん、卵巣がん等）に対して、抑制効果を示すと考えられる。

15 産業上の利用可能性

本発明の制がん剤は、乳がん、肺がん、咽頭がん、胃がん、膵がん、肝がん、結腸がん、子宮がん、卵巣がん、前立腺がん等の治療に用いることができる。

請 求 の 範 囲

1. BLアンジオスタチンを有効成分として含む制がん剤。
2. BLアンジオスタチンが、哺乳動物に由来する、請求の範囲第1項に記載の制がん剤。
5
3. BLアンジオスタチンが、ヒトプラスミノーゲンの $G1u^1-Ser^{441}$ 、
 $G1u^1-Val^{449}$ 、 $Ph e^{75}-Ser^{441}$ 及び $Ph e^{75}-Val^{449}$ 断片からなる群より選択される、請求の範囲第1又は2項に記載の制がん剤。
4. 下記工程：
10 アガロースゲル上にバシロライシンMA及びリシンを固定したアフィニティトラップリアクターを緩衝液で平衡化する工程、
クエン酸処理した血清を添加する工程、
塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄する工程、及び
6 —アミノヘキサン酸で溶出する工程からなる、請求の範囲第1項に記載のBL
15 アンジオスタチンの製造方法であって、上記緩衝液が、イソプロピルアルコールを含まないことを特徴とする、製造方法。

1/5

図 1

1 2

(kDa)

205 -

116 -

97.4 -

66 -

45 -

29 -

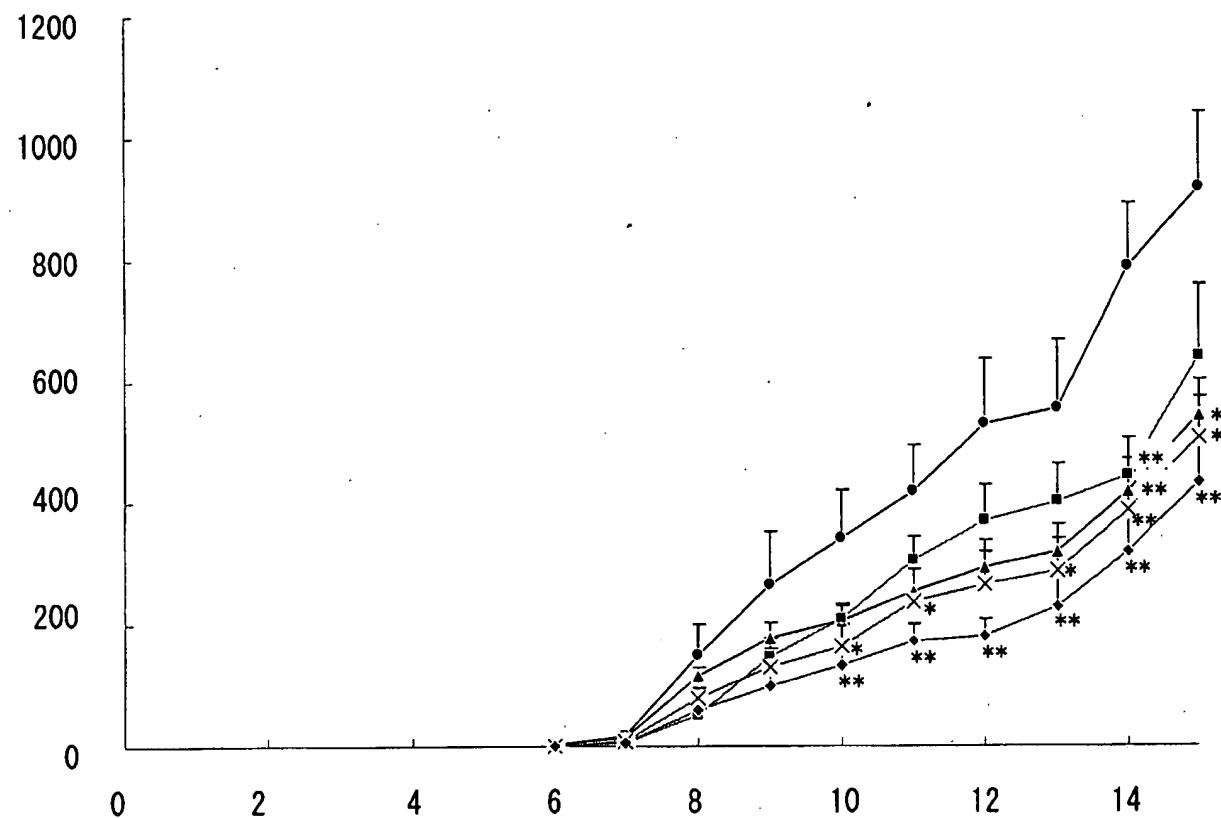
プラスミノーゲン

BLアンジオスタチン

ミニプラスミノーゲン

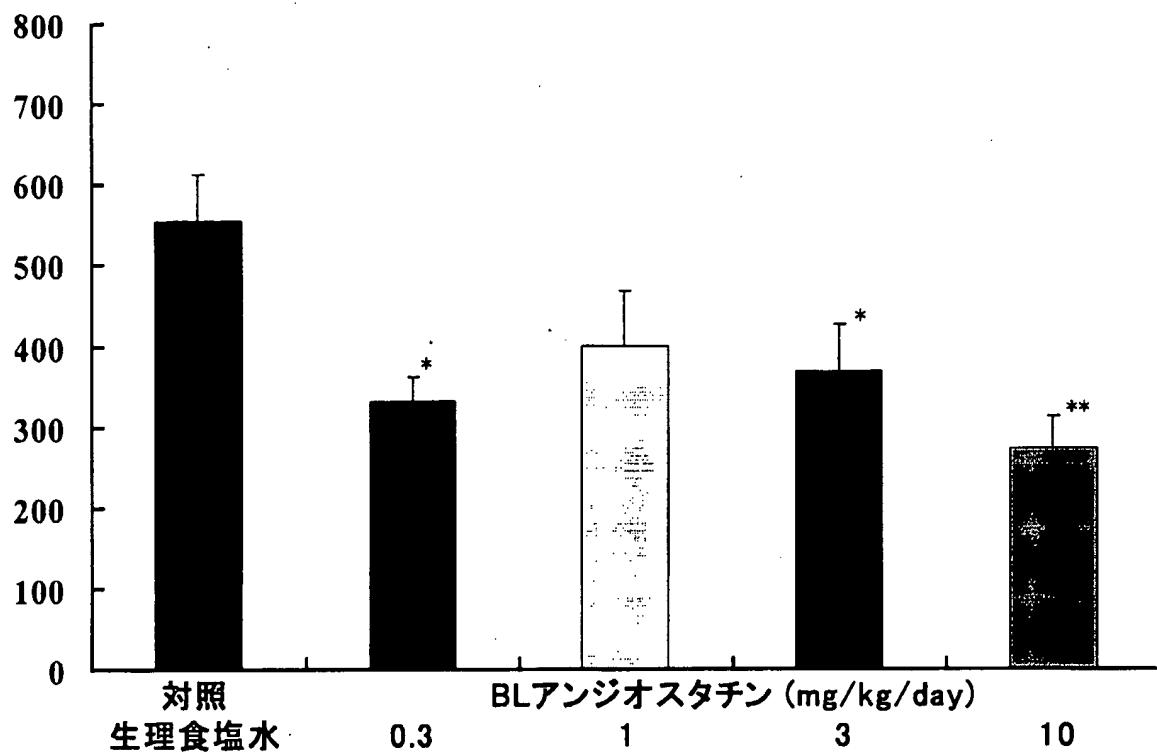
2/5

図 2



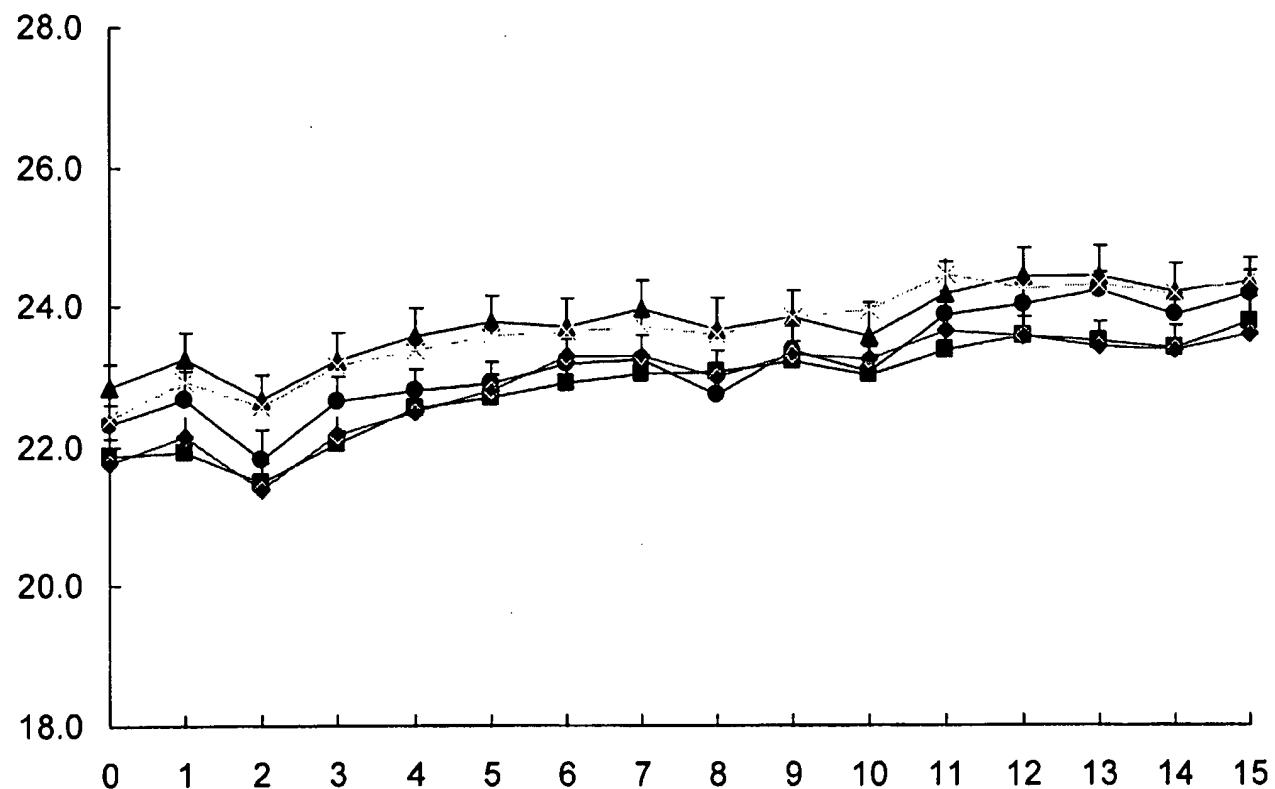
3/5

図 3



4/5

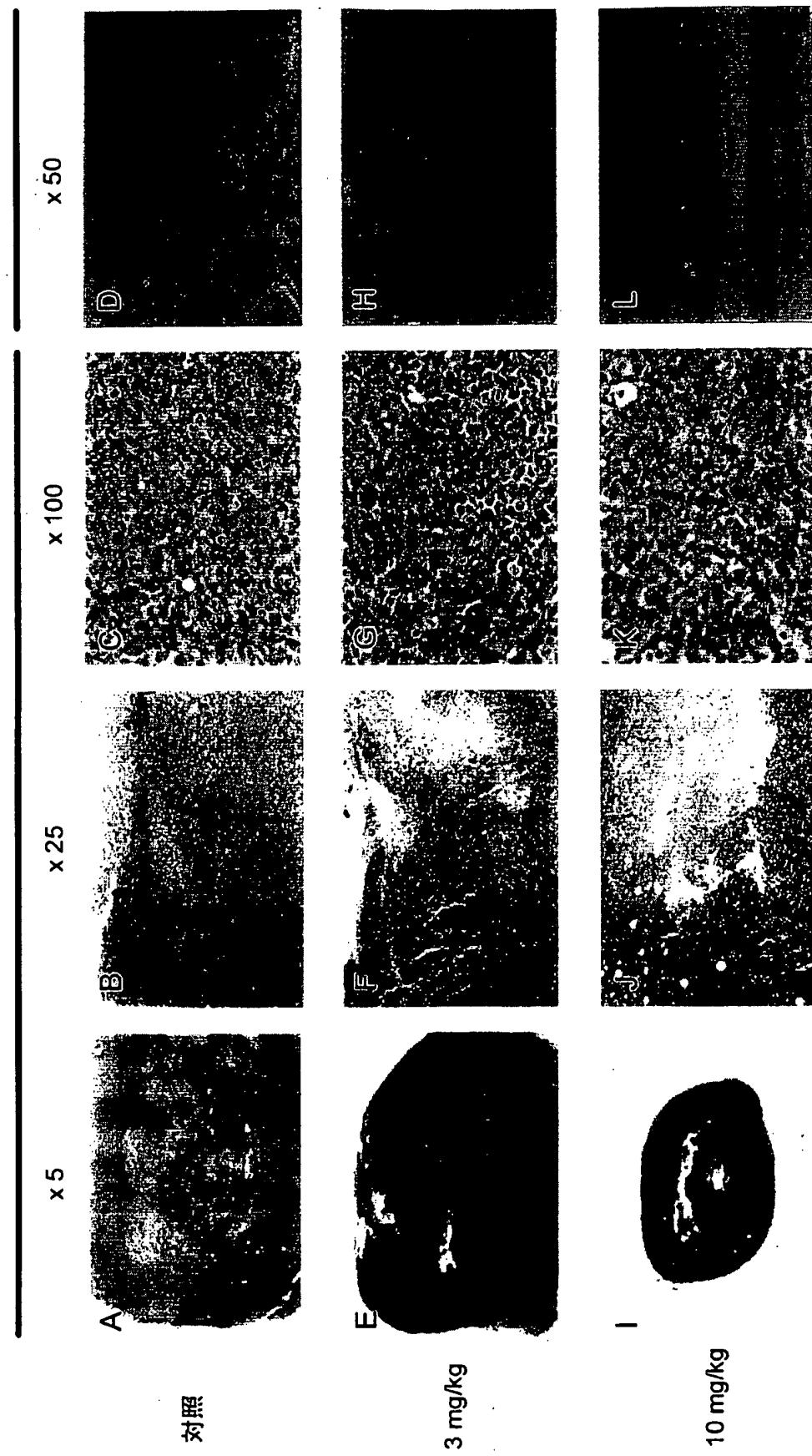
図 4



5/5

図 5

Von Willebrand
因子免疫染色



腫瘍の病理組織像および von Willebrand 因子免疫染色像

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 45/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 45/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-272453 A (Japan Science and Technology Corp.), 24 September, 2002 (24.09.02), Full text (Family: none)	1-3
Y	SHIMIZU, Kousuke et al., Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2003, Vol.2003, page 258	1-4
Y	JP 9-286798 A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 04 November, 1997 (04.11.97), Full text (Family: none)	1-4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 April, 2004 (28.04.04)Date of mailing of the international search report
18 May, 2004 (18.05.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002124

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96/35774 A2 (The Children's Medical Center Corp.), 14 November, 1996 (14.11.96), Full text & JP 11-508228 A	1-4
Y	WO 98/54217 A2 (The Children's Medical Center Corp.), 03 December, 1998 (03.12.98), Full text & JP 2001-506506 A	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002124

Box No. II**Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III**Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of claims 1-3 is common to the invention of claim 4 in relating to BL angiostatin. However, since the BL angiostatin is described in JP 2002-272453 A and is publicly known, it does not appear that between these inventions, there is a technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features.

Therefore, it is found that this international application does not satisfy the requirement of unity of invention.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 A61K38/17, 45/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 A61K38/17, 45/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992
日本国公開実用新案公報 1971-1992
日本国登録実用新案公報 1994-1996
日本国実用新案登録公報 1996-2004

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-272453 A (科学技術振興事業団) 2002. 09. 24 全文 (ファミリーなし)	1-3
Y	SHIMIZU, Kousuke et al, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2003, Vol. 2003, page 258	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
28. 04. 2004

国際調査報告の発送日 18. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
岩下 直人

4C 9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 9-286798 A (財団法人化学及血清療法研究所) 1997. 11. 04 全文 (ファミリーなし)	1-4
Y	WO 96/35774 A2 (The Children's Medical Center Corporation) 1996. 11. 14 全文 & JP 11-508228 A	1-4
Y	WO 98/54217 A2 (The Children's Medical Center Corporation) 1998. 12. 03 全文 & JP 2001-506506 A	1-4

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-3に記載の発明と請求項4に記載の発明とは、BLアンジオスタチンに関するものである点で共通しているが、BLアンジオスタチンは、「JP 2002-272453 A」にも記載されるように公知であるから、これらの発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係が存するものとは認められない。よって、本国際出願は発明の単一性の要件を満たさないものと認められる。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。